



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Moringa oleífera* “moringa” COMPARADO CON CIPROFLOXACINO SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTORA:

RUTH CIRA CÁCERES IQUIAPAZA

ASESORES:

DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

MG. BLGO. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRASMISIBLES

Trujillo – Perú

2018

DEDICATORIA

*Se Lo Dedico a Dios, Quien Me Guía
y protege y está presente todos los
días de mi vida y me ayudó a lograr
mis metas.*

*A mi familia, en especial a mi madre
y hermanos, quienes me brindan su
amor, y confiaron en mí para lograr
mis metas.*

RUTH CIRA CÁCERES IQUIAPAZA

AGRADECIMIENTO

A Dios

Por darme la fortaleza para no dejar que la adversidad me venza, me iluminó cada día para finalmente llegar a dar este gran paso.

**A mis asesores: Dra. María Rocío Del Pilar Llaque Sánchez Y
Mg. Blgo. Jaime A. Polo Gamboa**

Quienes me brindaron su tiempo y conocimientos en la realización de este proyecto.

A la Universidad

Por ser mi alma mater y el lugar donde aprendí y compartí nuevas experiencias en toda mi vida universitaria

RUTH CIRA CÁCERES IQUIAPAZA

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: **EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Moringa oleífera* “*moringa*” COMPARADO CON CIPROFLOXACINO SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922**, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para el título Profesional de Médico Cirujano.

(LA AUTORA)

INDICE

PAGINAS PRELIMINARES	Pág.
PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÓN	v
INDICE.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	1
1.2 TRABAJOS PREVIOS	2
1.3 TEORIAS RELACIONADAS AL TEMA	5
1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	10
1.5 JUSTIFICACIÓN	10
1.6 HIPÓTESIS:.....	10
1.7 OBJETIVOS.....	11
1.7.1 OBJETIVO GENERAL:	11
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	11
II. MÉTODO.....	12
2.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	12
2.2 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN.....	12
2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	14
2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD.....	15
2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS	16
2.6 ASPECTOS ÉTICOS:	16
III. RESULTADOS.....	17
IV. DISCUSIÓN	19
V. CONCLUSIONES	22
VI. RECOMENDACIONES.....	23
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24
VIII. ANEXOS	28

RESUMEN

OBJETIVO: Se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” comparado con ciprofloxacino a 5 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922. **MATERIAL Y MÉTODO:** Se realizaron cuatro diluciones (100%, 75%, 50% y 25%), un control positivo con ciprofloxacino (5 µg), y un control neutro con DMSO; se aplicó el método Kirby-Bauer (discos de difusión) en agar Mueller-Hinton en 10 placas Petri con un total de 50 observaciones. **RESULTADOS:** Se obtuvo que el extracto etanólico de las hojas *Moringa oleífera* muestra halos de inhibición a partir de la dilución al 75% con 13.90 mm (DS: 0.738±0.233, IC 95%; 13.37-14.43), Al 100% el halo de inhibición fue de 17.70 mm (DS: 1.059±0.335, IC95%; 16.94-18.46), sin embargo, estos valores no superan el halo de inhibición del medicamento: ciprofloxacino (29.70mm DS: 0.823±0.260, IC95%; 29.11–30.29). El análisis estadístico ANOVA fue altamente significativo (0.000), al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados eran homogéneos y el grupo con mayor halo de inhibición fue para ciprofloxacino, seguido del extracto etanólico al 100% de la planta en estudio, se observa que a mayor concentración el halo de inhibición aumenta. **CONCLUSIONES:** Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* si tiene efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922. Pudiendo ser este producto utilizado como un medicamento coadyuvante en el tratamiento de enfermedades producidas por *Escherichia coli*.

Palabras Claves: Extracto etanólico, *Moringa oleífera*, *Escherichia coli*, Efecto antimicrobiano.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The antimicrobial effect of the ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves "moringa" compared with ciprofloxacin at 5 µg on strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 was evaluated. **MATERIAL AND METHOD:** Four dilutions were made (100%, 75%, 50% and 25%), a positive control with ciprofloxacin (5 µg), and a neutral control with DMSO; the Kirby-Bauer (diffusion discs) method was applied in Mueller-Hinton agar in 10 Petri dishes with a total of 50 Observations. **RESULTS:** It was obtained that the extract ethanolic of the leaves *Moringa Oleifera* shows halos of inhibition from the dilution to 75% with 13.90 mm (DS: 0.738 ± 0.233 , IC 95%; 13.37-14.43), at 100% the inhibition halo was 17.70 mm (DS: 1.059 ± 0.335 , IC95%; 16.94-18.46), however, these values do not exceed the halo of drug inhibition: ciprofloxacin (29.70 mm DS: 0.823 ± 0.260 , IC95%; 29.11 – 30.29). The statistical analysis ANOVA was highly significant (0.000), as the Tukey test showed that the evaluated groups were homogeneous and the group with greater inhibition Halo was for ciprofloxacin, followed by the extract ethanolic to 100% of the plant in Study, it is observed that at higher concentration the halo of inhibition increases. **CONCLUSIONS:** It is concluded that the ethanolic extract of the leaves of *Moringa oleifera* if it has antimicrobial effect on *Escherichia coli* ATCC 25922. May be this product used as an adjuvant medicine in the treatment of diseases produced by *Escherichia coli*.

Key words: Ethanolic extract, *Moringa oleifera*, *Escherichia coli*, antimicrobial effect.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA

Según la organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades infecciosas, en la actualidad ocupan el tercer lugar en generar mortalidad mundial, dentro de este grupo de enfermedades identificamos que la patología diarreica es la primera causa de morbimortalidad en los menores de 5 años, causando de forma anual aproximadamente 520 000 fallecimientos, así mismo se han identificado que los pacientes inmunocomprometidos y los desnutridos tiene mayor riesgo de morir por diarrea. En los países en vías de desarrollo se han identificado que los pacientes menores de 3 años, en promedio tienen 3 episodios diarreicos anualmente.¹

Escherichia coli es un patógeno bacteriano, perteneciente al grupo de los Gram negativos, es un organismo básicamente anaerobio facultativo, su metabolismo se basa en la fermentación de hidratos de carbono (glucosa), para formar ácido acético, láctico y fórmico. El hábitad natural de *E. coli* es el tracto gastrointestinal del hombre y de aquellos animales de sangre caliente. En su mayoría las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo, existen algunos serotipos con mayor actividad virulenta como es *E. coli* 0157:H7, dicho serotipo produce la toxina shiga. Se precisa que hasta el 10% de los patógenos productores de toxina Shiga, puede generar síndrome hemolítico urémico (SHU), con una tasa de mortalidad del 5%.²

Las enfermedades diarreicas según la organización panamericana de salud (OPS), en su mayoría son transmitidas por aquellos alimentos contaminados, es así que la estimación que se tiene por dicha institución sanitaria es de 600 millones de pacientes infectados por medio alimentario con el consiguiente desarrollo de patología diarreica. En la población pediátrica se han identifica a *Escherichia coli*, *Campylobacter* y *salmonella* como los microorganismos con mayor prevalencia en la patología diarreica aguda.³

Moringa Oleífera es una planta de alto valor nutricional ya que casi todas las partes del árbol (hojas, raíces, cortezas, frutas, flores, vainas inmaduras y semillas) tienen unos componentes bioactivos de forma homogénea, el principal componente relacionado con la actividad antibacteriana es incluidos; 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi) isotiocianato de bencilo, 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato, niacimicina, pterigospermina, isotiocianato de bencilo y 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) bencil glucosinolato. Dichos componentes están presentes de forma homogénea en todas las partes de la planta.⁴

1.2 TRABAJOS PREVIOS

Emad M. (Arabia Saudita, 2016) estudiaron la actividad antibacteriana de *Moringa oleífera* sobre *S. aureus* y *E. coli*, mediante la técnica de difusión en discos de agar. Los resultados obtenidos, fueron para *Staphylococcus aureus*, un halo de $(10.3 \pm 0.3 \text{ mm})$ a una concentración de 200 mg/ml, y para *Escherichia coli* un halo de $(7.0 \pm 0.0 \text{ mm})$ a una concentración de 200 mg/ml. El autor concluyo que moringa tiene mejor efecto en gérmenes Gram-positivos que los Gram-negativos, motivando a estudiar con más patógenos y a diferentes diluciones.⁵

Dorothea H. et al (Namibia, 2016) determinaron el efecto antibacteriano del extracto de *Moringa oleífera* sobre *B. cereus*, *E. coli* y *E. fecalis* mediante el método de difusión en placas de agar, así mismo emplearon como control positivo a ampicilina. Los resultados obtenidos fueron para *Escherichia coli* un halo de 10 mm, para *B. cereus* un halo de 7 mm y para *E. fecalis* un halo de 10 mm y para ampicilina su halo fue de 16 mm. Los autores concluyeron que el efecto antibacteriano de moringa es reducido frente al antibiótico control.⁶

Abdulkadir I. et al (Nigeria, 2015) determinaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Moringa oleífera*, a diferentes concentraciones (100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml y 12.5 mg/ml), mediante el método de difusión en discos de agar, sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados encontrados fueron un halo de inhibición de 10.8 mm a una concentración de 50 mg/ml para *Staphylococcus aureus* y para *Escherichia coli* un halo de 11.7 mm a una concentración de 100 mg/ml. Los autores concluyeron que Los extractos de etanol de todas las partes de *Moringa oleífera* utilizados en este experimento mostraron actividad antimicrobiana variable y significativa contra los patógenos de prueba, esto apoya el hecho de que *Moringa oleífera* contiene fitoquímicos activos que exhiben potenciales antimicrobianos.⁷

Yetunde E. et al (Nigeria, 2015) evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Moringa oleífera* a diferentes concentraciones (400 mg/ml, 200 mg/ml, 100 mg/ml y 50 mg/ml), mediante la técnica de difusión en placas de agar sobre patógenos Gram-positivos y Gram-negativos. Los resultados encontrados para *Escherichia coli* un halo de inhibición de 10 mm a una concentración de 200 mg/ml y un halo de 12 mm a una concentración de 400 mg/ml, para *S. aureus* un halo de 10 mm y para *Proteus vaginalis* un halo de 12 mm a concentraciones de 400 y 200 mg/ml respectivamente. Los autores concluyeron que el extracto de etanol a partir de la concentración de 200 mg presento mayor eficacia.⁸

Kalpana S. Moorthi S. (India, 2013) estudiaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Moringa oleífera* sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante la técnica de difusión en placas de agar. Los resultados encontrados fueron para *E. coli* un halo de (9.3 ± 0.46 mm) a una concentración de 600mg, para *K. pneumoniae* un halo de (8.3 ± 0.91 mm) y para *S. aureus* un halo de (12.6 ± 0.94 mm) a concentraciones de 600mg. Los autores concluyeron que el extracto etanólico de moringa posee buen efecto anti bacteriano frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.⁹

Adetitun D. et al (Nigeria, 2013) determinaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Moringa oleífera* a diferentes concentraciones (100 mg/ml, 75 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml y 5 mg/ml) sobre bacterias de muestra clínica (Gram positivas y negativas) mediante la técnica de difusión en discos de agar. Los resultados hallados fueron para *S. aureus* un halo de 5 mm a una concentración de 50 mg/ml, para *E. coli* un halo de 16 mm a una concentración de 75 mg/ml y para *K. pneumoniae* un halo de 10 mm a una concentración de 25mg/ml. Los autores concluyeron que el extracto etanólico de Moringa tiene buen efecto antibacteriano con patógenos Gram negativos de muestra clínica.¹⁰

Devendra B. et al (India, 2011) identificaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Moringa oleífera* sobre patógenos bacterianos Gram-positivos y negativos mediante la técnica de difusión en discos de agar. Los resultados encontrados fueron para *E. coli* un halo de 8.8 ± 1.0 mm, para *P. aeruginosa* un halo de 9.5 ± 0.5 mm, para *S. pyoneges* 7.0 ± 0.5 mm, para *Staphylococcus aureus* un halo de 6.2 ± 0.7 mm, para *C. albicans* 6.2 ± 0.5 mm y para *Aspergillus niger* 7.3 ± 0.5 mm. Concluyeron que el extracto etanólico de moringa es más eficaz en patógenos Gram negativos que los Gram positivos y hongos.¹¹

Hitzschky G. et al (Brasil, 2010) identificaron la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Moringa Oleífera* a diferentes concentraciones (200 mg/ml, 150mg/ml, 100mg/ml y 50mg/ml), sobre patógenos Gram positivos y negativos mediante la técnica de difusión en discos de agar. Los resultados encontrados fueron para *Escherichia coli* un halo de (23 ± 2.5) mm a una concentración de 100 mg/ml, para *Staphylococcus aureus* un halo de 26 mm a una concentración de 50 mg/ml. Los autores concluyeron que el extracto etanólico de moringa posee buen efecto antibacteriano con cepas Gram negativas.¹²

1.3 TEORIAS RELACIONADAS AL TEMA

Escherichia coli es un patógeno bacteriano, perteneciente al grupo de los Gram negativos, no formadora de esporas, puede o no tener flagelos, estructura que le confiere movilidad. *E. coli* es un organismo básicamente anaerobio facultativo, su metabolismo se basa en la fermentación de hidratos de carbono (glucosa), para formar ácido acético, láctico y fórmico¹³.

Las condiciones óptimas de crecimiento son básicamente aquellos medios ácidos (pH: 4.3-6.0), así como las bajas temperaturas. El hábitat natural de *E. coli* es el tracto gastrointestinal del hombre y de aquellos animales de sangre caliente, en su mayoría las cepas de *E. coli* son inofensivas, la función que cumplen estas cepas bacterianas en el tracto gastrointestinal del hombre es suprimir el desarrollo y crecimiento de bacterias dañinas, así como la síntesis de algunas vitaminas. Sin embargo, existen cuatro tipos de *E. coli* que son causantes de patología diarreica aguda, entre ellas tenemos a *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigenica, con características particulares con cada una de ellas.¹⁴

Escherichia coli enteropatógena, tiene un tiempo de inicio de enfermedad de 3 días con una duración aproximadamente de 6-72h. La forma de transmisión es por aguas contaminadas con heces, esta cepa causa un síndrome diarreico severo en la población pediátrica con una duración mayor a dos semanas que puede llegar a generar la muerte por deshidratación; en los adultos causa una sintomatología caracterizada por náuseas, vómitos, diarrea severa, dolor abdominal con cefalea, fiebre y escalofríos.¹⁵

Escherichia coli enterotoxigenica, tiene la capacidad de multiplicación intestinal con la producción de enterotoxinas. Este proceso diarreico puede llegar a durar por lo menos 2 semanas. A esta cepa comúnmente se le atribuye la “diarrea del viajero”, que se caracteriza por lo general en pacientes que migran de países desarrollados a aquellos en vías de desarrollo, este tipo de cepa entérica se caracteriza por que no genera grandes proporciones de pirógenos endógenos, con la consiguiente normotermia en los pacientes portadores. La dosis necesaria para causar diarrea es de 110-1000 microorganismos. Por lo general son transmitidos por aguas residuales sin procesar.¹⁶

Escherichia coli enteroinvasiva tiene el tiempo de parición más corto en comparación con otros tipos de *E. coli* que es de 24h posterior a la ingesta de alimentos contaminados. El cuadro clínico es similar a la *Shigelosis*, así mismo el mecanismo de agresión es por la penetración y destrucción de la mucosa intestinal. El cuadro clínico incluye cefaleas, mialgias, dolor abdominal, escalofríos y diarreas profusas. Para generar la patología diarreica se requiere de la ingesta de por lo menos 105 microorganismos.¹⁷

Escherichia coli enterohemorrágica, encontramos a una cepa específicamente tipificada la *E. coli* 0157:H7, con un periodo de incubación de nueve días aproximadamente. Se caracteriza por causar un cuadro clínico de dolor abdominal, pero siempre seguido de diarrea sanguinolenta. En la población pediátrica tiene mayor importancia ya que este tipo de *E. coli* tiene la capacidad de producir una toxina muy virulenta (toxina Shiga) capaz de causar un síndrome hemolítico-urémico (SHU), el cual es considerado como la principal causa de insuficiencia renal aguda en pacientes pediátricos, y a menudo dicho síndrome requiere el uso de diálisis.¹⁸

Según la FDA la cantidad infecciosa de *E. coli* 0157:H7 es de tan solo 10 microorganismos, convirtiéndola en un problema de salud pública sanitario en la población pediátrica, así como en ancianos y pacientes inmunodeprimidos. La incidencia anual estimada es de 200 000 casos, lo que resulta anualmente en 400 fallecimientos.¹⁸

En términos generales la transmisión de *Escherichia coli* es por medio de alimentos crudos, en particular aquellos de origen animal entre ellos podemos nombrar a los más prevalentes como la leche cruda, las aguas residuales, las hamburguesas, que en muchos casos son producto de un lavado de manos inadecuado. El control de este tipo de enteropatógenos se puede lograr de dos formas. La primera consiste en un control de lavado de manos ante cualquier manipulación de alimentos, en segundo lugar, la adquisición de alimentos en particular carnes de ganado vacuno y aves de corral de proveedores con certificación sanitaria de alta calidad.¹⁹

Moringa oleífera es originaria de Asia, en los valles sub Himalayos, pero con el paso del tiempo se ha extendido por toda la superficie terrestre el mayor cultivo esta favorecido en regiones subtropicales. Este vegetal tiene la capacidad de crecer en colinas, laderas o a nivel del mar, pero es más común encontrarla en praderas y orillas de río. *Moringa* está considerado como un árbol dicotiledónico perenne, los medios de cultivo idóneos para su desarrollo son las temperaturas de 25 – 35°C bajo la iluminación solar directa y en tierras con medio alcalino u ácido (pH: 5.0-9.0).²⁰

Moringa pertenece al reino *Plantae*, en el orden *Brassicales*, de la familia *Moringaceae*, en el género *Moringa* y de la especie *Moringa oleífera*. *Moringa* es un árbol verde que puede alcanzar una altura de hasta 10 metros de altura en un año. La raíz tiene una forma globosa y pivonante el cual les brinda resistencia frente a los periodos de sequía prolongados.²¹

El tronco es la parte del vegetal con mayor longitud donde rara vez sobrepasa los 10 metros. Las hojas son ovaladas de unos 20 cm de largo, poseen una coloración verde clara con esta droga vegetal tiene propiedades nutricionales importantes, gracias al 27% de proteínas además de la cantidad significativa de vitaminas A y C, así también como el calcio, hierro y fosforo.²¹

Las flores tienen una coloración crema muy numerosa y fragante con propiedad bisexual, que mide hasta 15 cm de largo. La corteza es blanquecina y su fruto tiene forma de vaina encapsulada de color pardo, con tres caras separadas por surcos longitudinales, aproximadamente de hasta 45 cm de largo. El árbol comienza a producir frutos a partir de los 6 meses.²¹

La composición química de *Moringa Oleífera* se ha descrito diferentes Fito constituyentes como son los ácidos fenólicos, el grupo de flavonoides, los tocoferoles, carotenoides, ácidos grasos polinsaturados, minerales altamente biodisponibles como el folato, una variedad de vitaminas y una cantidad significativa de entre todo el género moringa de glucocinolatos.²²

Los glucocinolatos entre ellos el 4,0-bencilglucocinolato (glucomoringa) es el que predomina en las semillas, hojas y tallo. Este glucocinolato es catabolizado por la enzima endógena de planta MIROZINASE que se encuentra en mayor porcentaje en las hojas y semillas, producto de esta reacción enzimática se obtiene isotiocianatos, nitrilos y tiocarbamatos, estos metabolitos tienen propiedades hipotensoras y espasmolíticos.²³

Los flavonoides que predominan en *Moringa* son los derivados de quercetina, apigenina y kaempferol los cuales de confieren propiedades antioxidantes. *Moringa oleífera* se ha caracterizado como uno de los vegetales con mayor porcentaje de folatos como son el ácido-5-fenil-

5,6,7,8-tetrahidrofolato, el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofolico, el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofolico y el ácido 10-HCO-folico, estos folatos se caracterizan por ser altamente biodisponibles, en comparación con otros vegetales ricos en folatos. Los folatos tienen propiedades oxidativas y funcionales en el desarrollo del tubo neural.²⁴

El ciprofloxacino es un antibiótico del tipo 4-quinolona fluorada o fluoroquinolona, y es activo frente a un amplio espectro de gérmenes Gram-negativos aerobios, incluyendo patógenos entéricos, estos inhiben la proliferación in vitro de la *Escherichia coli*, pero no es activo frente a gérmenes anaerobios.²⁵

Su mecanismo de acción es inhibir la DNA-girasa y la topoisomerasa IV bacteriana. Estas moléculas turban el DNA implantando pliegues súper helicoidales en la estructura de doble cadena, proporcionando su desenrollado en dos cadenas. La DNA-girasa está compuesta por dos subunidades que son reguladas por el gen *gyrA*, y actúan escindiendo el cromosoma bacteriano para luego reconstruir y formar una la superhélice. Las quinolonas inhiben estas moléculas de tal forma evitan la replicación y la transcripción del material genético bacteriano, así mismo como todo este grupo de antibióticos el ciprofloxacino posee una biodisponibilidad del 80%, un efecto post-antibiótico de 4 horas luego de estar expuesto a los gérmenes.^{25, 26}

El ciprofloxacino se utiliza generalmente para el tratamiento de diversas patologías entre ellas las infecciones del tracto urinario ITU, Gastroenteritis aguda infecciosa, infecciones de las vías respiratorias, neumonía, enfermedades de transmisión sexual, se administra por vía oral y endovenosa y su espectro de acción incluyen principalmente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiellas*, *Enterobacter*, *Salmonella* y *Shigella*.^{25,26}

1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El extracto etanólico de las hojas *Moringa oleífera* “moringa” comparado con ciprofloxacino a 5 µg, tiene efecto antimicrobiano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, en un estudio in vitro?

1.5 JUSTIFICACIÓN

Escherichia coli es un patógeno productor de infecciones intestinales muy frecuentes y severas, reportándose un aumento de la resistencia a los antimicrobianos de uso común, por cuyo motivo se está recurriendo de manera constante a la búsqueda de alternativas eficaces y seguras que provienen de recursos naturales, donde sus principios no causen reacciones adversas. Bajo el conocimiento de la existencia de aceites esenciales y extractos con propiedades antisépticas y bactericidas de varias plantas en nuestra región, campo que por lo demás es poco explorado, aunque si en varios países del mundo, es que se pretende realizar la presente investigación, la cual busca conocer si el Extracto etanólico de la hoja de *Moringa oleífera* “moringa” tiene acción bactericida contra *Escherichia coli*, ya que los resultados afirmativos supondrían información alentadora que permita plantear alternativas para la obtención de un preparado antimicrobiano útil, sin efectos indeseables y económicos, para dicho patógeno.

1.6 HIPÓTESIS:

H₁: El extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” tiene efecto antimicrobiano comparado con ciprofloxacino a 5 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, en un estudio in vitro.

H₀: El extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” no tiene efecto antimicrobiano comparado con ciprofloxacino a 5 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, en un estudio in vitro.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” comparado con *ciprofloxacino* a 5 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, en un estudio in vitro.

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la hoja de *Moringa oleífera*. al 100%
- Determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la hoja de *Moringa oleífera* al 75%
- Determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la hoja de *Moringa oleífera* al 50%
- Determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la hoja de *Moringa oleífera* al 25%
- Identificar el efecto antimicrobiano del *ciprofloxacino* a 5 µg.

II. MÉTODO

2.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACION: Experimental con repeticiones múltiples, post prueba

RG₁	X₁	O₁
RG₂	X₂	O₂
RG₃	X₃	O₃
RG₄	X₄	O₄
RG₅	X₅	O₅
RG₆	X₆	O₆

Dónde:

RG₁₋₆: Grupos de estudio

X₁: Extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa” al 100%

X₂: Extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa” al 75%

X₃: Extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa” al 50%

X₄: Extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa” al 25%

X₅: Control positivo: Ciprofloxacino 5 µg

X₆: Control negativo: Dimetil Sulfoxido (DMSO)

O₁₋₆: Las observaciones del diámetro del halo de inhibición

2.2 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antimicrobiano.

- **Agente antimicrobiano no farmacológico:** Extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa”
- **Agente antimicrobiano farmacológico:** Ciprofloxacino a 5 µg

VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antimicrobiano.

- **Si efecto antimicrobiano:** aumento del halo ≥ 21 mm
- **No efecto antimicrobiano:** disminución del halo < 21 mm

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antimicrobiano	Agente antimicrobiano no farmacológico: <i>Moringa oleífera</i> “moringa”. Agente antimicrobiano farmacológico: Ciprofloxacino.	La <i>Moringa oleífera</i> “moringa” fue dividida en las siguientes concentraciones: - 100% - 75% - 50% - 25% - Ciprofloxacino 5µg - Dimetil Sulfóxido (DMSO)	RG ₁ RG ₂ RG ₃ RG ₄ RG ₅ RG ₆	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antimicrobiano	Se medirá mediante el incremento del halo de inhibición por medio del método Kirby- Bauer. ²⁸	Se consideró: Sensible: ≥ 21 mm Intermedio: 16-20 mm Resistente: ≤15mm ³⁰	Si efecto antimicrobiano: ≥ 21 mm No efecto antimicrobiano: < 21 mm	Cualitativa nominal

2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACION: Estuvo constituida por todas las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 cultivadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo.

MUESTRA:

Tamaño muestra:

Por tratarse de un trabajo experimental se empleó la formula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición, para hallar el número de placas necesarias que validen la investigación.²⁷ Fue constituida por 10 repeticiones por cada grupo de dilución y los respectivos controles. **(Ver Anexo 01)**

Unidad de análisis: Cada uno de los cultivos de cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

Unidad de muestra: Cada placa Petri con cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

Muestreo: se aplicó el muestreo no probabilístico.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Placas Petri con cultivos viables.
- Cepas cultivadas de 18 -24 horas.

Criterios de exclusión:

- Cepas que no crecieron en el medio de cultivo.
- Cepas o muestra contaminada.

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA:

Se consideró la observación directa de los cultivos en las placas Petri.

PROCEDIMIENTO: En el estudio se siguieron los siguientes pasos:

- a) La planta fue identificada taxonómicamente por el Herbario MOL – Augusto Weberbauer de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina - LIMA. **(Ver Anexo 02)**
- b) Se obtuvo el extracto etanólico de *Moringa oleífera*, mediante el método de maceración en etanol.²⁸ **(Ver Anexo 03)**
- c) Se utilizó el medio de cultivo agar Müller-Hinton, para el cultivo de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de acuerdo con el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.²⁹ **(Ver Anexo 04)**
- d) Se evaluó la sensibilidad antimicrobiana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M02-A12³⁰ y M100-S28³¹ del CLSI. **(Ver Anexo 05)**

INSTRUMENTO:

El instrumento que se utilizó fue la ficha de recolección de datos que consistió en enumerar las placas, diluciones en cada placa y halos de inhibición a las 48 horas. **(Ver Anexo 06).**

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento fue validado por 3 profesionales médicos del área de microbiología que garantiza la confiabilidad del estudio. **(Ver Anexo 07).**

2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información obtenida fue procesada y tabulada en una ficha de Microsoft Excel 2016, y luego se analizó en el programa estadístico SPSS versión 25.0. Para los gráficos se utilizó el diagrama de cajas o bigotes.

Se aplicarán las pruebas estadísticas para homogenizar la muestra y luego análisis de varianza (ANOVA), para evaluar la diferencia significativa entre los diámetros.

El análisis post ANOVA Tukey permitirán identificar la dilución con la que se obtendrá el mayor tamaño de halo de inhibición.

2.6 ASPECTOS ÉTICOS:

En el estudio se tomó en cuenta las medidas de bioseguridad en el laboratorio dadas por el Ministerio de Salud.³² **(Ver Anexo 08)** Así mismo se consideraron la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

En el presente trabajo se respetó el principio de ética adoptado en el capítulo 6 de código de ética del Colegio Médico del Perú, especialmente el 6 art 48.³³

III. RESULTADOS

TABLA 01: Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” comparado con ciprofloxacino a 5 µg sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 en un estudio in vitro

Diámetro del halo de inhibición								
Tratamiento	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
EE <i>Moringa oleífera</i> al 100%	10	17.70	1.059	.335	16.94	18.46	16	19
EE <i>Moringa oleífera</i> al 75%	10	13.90	.738	.233	13.37	14.43	13	15
EE <i>Moringa oleífera</i> al 50%	10	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
EE <i>Moringa oleífera</i> al 25%	10	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
CIPROFLOXACINO	10	29.70	.823	.260	29.11	30.29	29	31
Total	50	12.26	11.421	1.615	9.01	15.51	0	31

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

TABLA 02: Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” comparado con ciprofloxacino a 5 µg sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 en un estudio in vitro

ANÁLISIS DE VARIANZA – ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre Grupos	6370.520	4	1592.630	3396.604	.000
Dentro de Grupos	21.100	45	.469		
Total	6391.620	49			

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

TABLA 03: Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” comparado con ciprofloxacino a 5 µg sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 en un estudio in vitro

Pruebas Post-hoc TUKEY

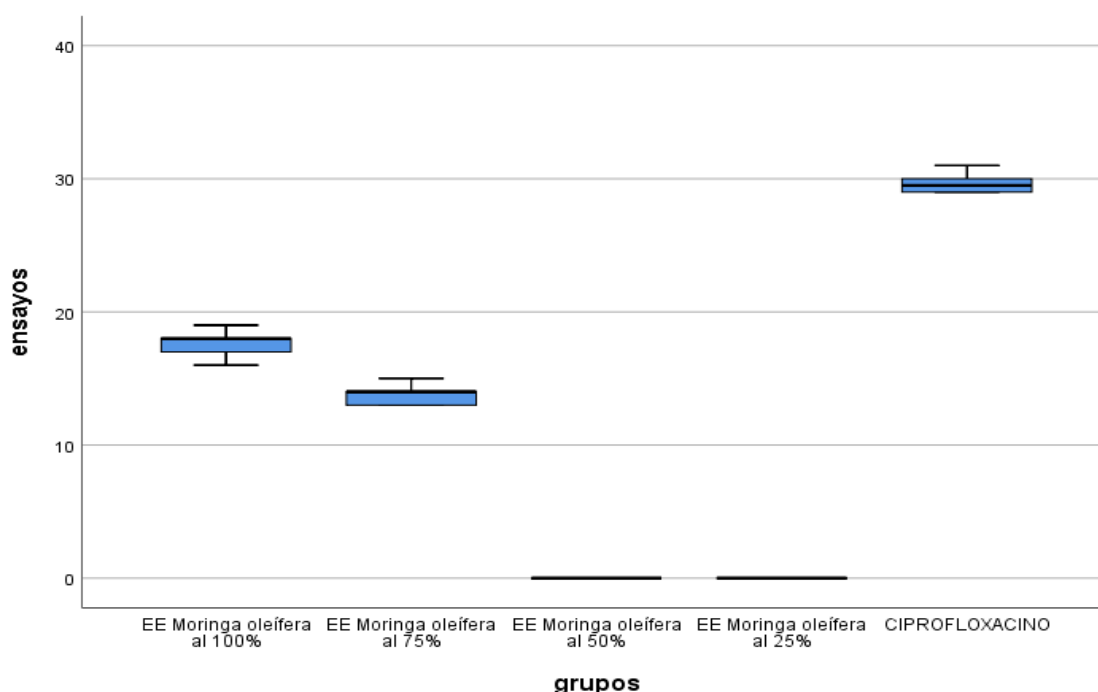
HSD Tukey^a

Grupos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
EE <i>Moringa oleífera</i> al 25%	10	.00			
EE <i>Moringa oleífera</i> al 50%	10	.00			
EE <i>Moringa oleífera</i> al 75%	10		13.90		
EE <i>Moringa oleífera</i> al 100%	10			17.70	
CIPROFLOXACINO	10				29.70
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25



Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

GRÁFICO 01: Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleífera* “moringa” comparado con ciprofloxacino a 5 µg sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 en un estudio in vitro

IV. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Moringa oleífera* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, comparado con ciprofloxacino 5µg, se desarrolló el presente estudio experimental in vitro; donde se observó 10 placas con un total de 50 cultivos. Para lo cual se hizo la obtención del extracto etanólico de la *Moringa oleífera*, en 4 diluciones del (100%, 75%, 50% y 25%), un disco de ciprofloxacino como grupo control positivo y un control negativo con Dimetil Sulfóxido (DMSO). El DMSO no se lo consideró dentro de los datos estadísticos por tener un valor nulo en los cultivos.

El extracto etanólico de *Moringa oleífera* tuvo efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 (Tabla 01), a partir de las concentraciones de 75% con un halo de inhibición de 13,90 mm (DS: 0.738 ± 0.233 . IC95%(13.37-14.43)) con un rango de 13 a 15 mm; a la concentración de 100% mostro un halo de inhibición de 17.70 mm (DS: 1.059 ± 0.335 , IC95%;16.94-18.46) con un rango de 16 a 19 mm, sin embargo, no supera los valores considerados por el CLSI (≥ 21 mm) para evaluarlos como sensible. El mayor halo de inhibición lo mostró ciprofloxacino, con 29.70 mm (DS: 0.823 ± 0.260 . IC95%(29.11- 30.29)) con un rango de 29 a 31 mm.

Así mismo se observa que estadísticamente los resultados son altamente significativos (Tabla 02: ANOVA:0.000) y homogéneos (Tabla 03, Test de Tukey). Sin embargo, al comparar los halos de inhibición con el patrón positivo de ciprofloxacino, se observa que esta muestra valores mayores de halo de inhibición que la dilución al 100% (Gráfico 01).

Según las normas de funcionamiento de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, utilizan los siguientes parámetros para clasificar la

sensibilidad del ciprofloxacino: $\leq 15\text{mm}$ (resistente), $16 - 20\text{mm}$ (intermedio), $\geq 21\text{ mm}$ (sensible).²⁹ En nuestro estudio utilizamos esos valores para determinar el efecto antimicrobiano de los tratamientos para *Escherichia coli*, encontrando que el extracto etanólico de *Moringa oleífera* se ubica en el rango de intermedio con 17.70 mm

Nuestros resultados son semejantes a los reportados por Adetitun D. et al¹⁰ (Nigeria, 2013) obtuvo un halo de inhibición de 16 mm a una concentración de 75 mg/ml . Y Hitzschky G et al¹² (Brasil, 2010) identificaron la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Moringa Oleífera* a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli* encontrando un halo de inhibición de $23 \pm 2.5\text{ mm}$ una concentración de 100 mg/ml , el mayor halo de inhibición que se encontró en la literatura revisada.

Por otra parte nuestros resultados son mayores a los obtenidos por Emad M.⁵ (Arabia Saudita, 2016) quienes estudiaron la actividad antibacteriana de *Moringa oleífera* sobre *Escherichia coli*, obtuvo un halo de $7.0 \pm 0.0\text{mm}$ a una concentración de 200 mg/ml . Devendra B. et al¹¹ (India, 2011) $8.8 \pm 1.0\text{ mm}$, Kalpana S. Moorthi S.⁹ (India, 2013) estudiaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Moringa oleífera* sobre, *Escherichia coli* encontrando un halo inhibición de $9.3 \pm 0.46\text{ mm}$ a una concentración de 600 mg .

Según Dorothea H. et al⁶ (Namibia, 2016) encuentra un halo de inhibición de 10 mm , al igual que Yetunde E. et al⁸ (Nigeria, 2015) 10 mm a una concentración de 200 mg/ml . Abdulkadir I. et al⁷ (Nigeria, 2015) reportó un halo de 11.7 mm a una concentración de 100 mg/ml .

Finalmente, las diferencias en los halos de inhibición dependen de la técnica utilizada para la extracción del producto, la forma de presentación (extracto etanólico, acuoso y/o aceite esencial), el terreno de cultivo (temperatura, altitud, humedad, estación de la cosecha, etc) que influyen en relación a la concentración de los principios activos en las plantas. Esta investigación es un aporte que permitirá contribuir a nuevos tratamientos contra *Escherichia coli*.

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa”, muestra efecto antimicrobiano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, in vitro a partir del 75% y 100%
- Las concentraciones de 25 y 50% del extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa”, no muestra efecto antimicrobiano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.
- El Ciprofloxacino a 5 µg tiene efecto antimicrobiano sobre de cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, in vitro, con halos de inhibición del crecimiento máximo de 31 mm y un mínimo de 29 mm.

VI. RECOMENDACIONES

- 1) Aislar los principios activos causantes de la actividad antibacteriana del Extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa”.
- 2) Evaluar el efecto antibacteriano utilizando extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa” en otras cepas bacterianas.
- 3) Realizar futuras investigaciones sobre las demás cualidades del extracto etanólico de *Moringa oleífera* como las antiparasitarias y antifúngicas.
- 4) Realizar experimentos en animales de bioterio, para evaluar su actividad antibacteriana o antifúngicas, en seres vivos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Organización mundial de la salud (OMS). Enfermedades infecciosas producidas por *Echerichia coli*. 2014. [Citado el 15/08/2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
2. Organización mundial de la salud (OMS). Enfermedades diarreicas agudas en la población pediátrica. 2015. [Citado el 15/08/2017] Disponible en: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
3. Organización panamericana de la salud (OPS). Enfermedades transmitidas por alimentos contaminados. 2014. [Citado el 15/08/2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
4. Leone A. Spada A. Battezzati A. Schiraldi A. Aristil J. Bertoli S. *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. 2016; vol 17:2141-2186. [Citado el 15/08/2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187941/pdf/ijms-17-02141.pdf>
5. Emad M. Abdallah. Antibacterial Properties of Leaf Extracts of *Moringa oleifera* Lam. Growing in Sudan. Arabia saudita. 5(1): 1-5, 2016. Disponible en: http://www.journalrepository.org/media/journals/JAMPS_36/2015/Oct/Abdallah512015JAMPS21386.pdf
6. Shailemo D, Kwaambwa H, Kandawa-Schulz M, Msagati T. Antibacterial Activity of *Moringa ovalifolia* and *Moringa oleifera* Methanol, N-Hexane and Water Seeds and Bark Extracts against Pathogens That Are Implicated in Water Borne Diseases. Namibia; 6, 71-77. 2016. disponible en: https://file.scirp.org/pdf/GSC_2016050518222480.pdf
7. Abdulkadir I, Abdullahi I, Sofowora A, Yahaya F, Alkasim A, Adamu I. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of Ethanolic Extracts of *Moringa oleifera* Lam on Isolates of Some Pathogens. Nigeria; 2015; vol 07: pág. 7-15. [Citado el 15/08/2017]. Disponible en

URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/phytochemical-screening-and-antimicrobial-activities-of-ethanolic-extracts-ofmoringa-oleifera-lam-on-isolates-of-some-pathogens-1920-4159-1000203.pdf>

8. Yetunde A, Sonye U. Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* Leaf against Isolates of Beef Offal. Nigeria; 2015; vol 09: pag 115-123. [Citado el 15/08/2017]. Disponible en URL: http://www.journalrepository.org/media/journals/BMRJ_8/2015/Jun/Alozie922015BMRJ17554.pdf
9. Kalpana S, Moorthi S, Kumara S. Antimicrobial activity of different extracts of leaf of *Moringa oleifera* (Lam) against gram positive and gram-negative bacteria. India. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2013) 2(12): 514-518 disponible en: <https://www.ijcmas.com/vol-2-12/S.Kalpana,%20et%20al.pdf>
10. Adetitun D, Araoye H, Akinyanju J, Anibijuwon I. The antimicrobial effects of the leaf extracts of *Moringa oleifera* on selected clinical bacterial isolates. (2013) 13 No.1: 95 – 113. Nigeria. disponible en: https://www.researchgate.net/publication/256838999_THE_ANTIMICROBIAL_EFFECTS_OF_THE_LEAF_EXTRACTS_OF_Moringa_oleifera_ON_SELECTED_CLINICAL_BACTERIAL_ISOLATES
11. Devendra B, Srinivas N, Prasad V, Swarna P. antimicrobial activity of *Moringa oleifera* lam., leaf extract, against selected bacterial and fungal strains. International Journal of Pharma and Bio Sciences. India. Vol 2(3) jul-sept 2011.disponible en: http://ijpbs.net/vol-2_issue-3/bio_science/2.pdf
12. Hitzschky G, Alves J, Ângelo A, Albuquerque R, Silva dos Fernandes R. Antibacterial effect (in vitro) of *moringa oleifera* and *annona muricata* against gram positive and gram-negative bacteria. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 52(3):129-132, May-June, 2010 disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v52n3/a03v52n3.pdf>
13. Brooks G. Carrol K. Buyel J. Morse S. Migtzner T. Microbiología médica. 25ª edición. Colombia, Santa Fe: Mc Graw Hill; 2010.

14. Forbes B. Sanm D. Weissfeld A. Trevio E. Diagnostico microbiológico. 11º edición. Uruguay: Editorial Médica Panamericana; 2004.
15. Murray P. Rosenthal K. Pfaller M. Microbiología Médica. 7ma. edición. Barcelona, España: El Sevier Masson; 2014.
16. Ammad N. Plorde J. Lawrence W. Sherris microbiologia medica. 5º edición. Colombia, Santa Fe: Mc Graw Hill; 2010.
17. Donarus A. Farreras P. Rozman C. Cardelach F. Medicina interna. 17º edición. Barcelona, España: El Sevier Masson; 2012.
18. Longo D. Kasper D. Jomson J. Fousi A. Houser S. Loscalzo J. Harrison principios de medicina interna. Vol 3. 18º edición. México D.F: Mc Graw Hill; 2008.
19. Goldman L. Ausiello D. Cecil tratado de medicina interna. Vol 2. 23º edición. Barcelona, España: El Sevier Masson; 2009.
20. Krapp K. Longe J. Medicina alternativa. 1º edición. Barcelona, España: Oceano/Ergon; 2010.
21. Cebrian J. Diccionario de plantas medicinales. 1º edición. Barcelona: Integra; 2012.
22. Garcia F. Mostacero J. Flora etnomedicinal de la región amazónica del Perú. 1º edición. Trujillo, Perú; 2009.
23. Robbers J. Tyler V. Las hierbas medicinales de Tyler uso terapéutico de la fitomecinas. 1º edición. Barcelona: Editorial Acribia S.A; 2006
24. Goldman L. Ausiello D. Cecil. Tratado de Medicina Interna. Vol 2. 23va ed. Barcelona, España: El Sevier Masson; 2009.
25. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I. y otros. Velásquez Farmacología básica y Clínica, 18^{ava} ed. Madrid: Panamericana; 2008. pp862.
26. Laurence B, Parker K, et. al. Manual de farmacología y terapéutica. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 12^{va} ed. Año 2010.

27. Dawson B. Trapp R. Bioestadística Médica, 4^{ta}. ed. México: Manual Moderno; 2005.
28. Carrión AV y García CR. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. [Tesis de titulación]. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
29. Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. [citado: 25 de junio del 2017]. Disponible en URL: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilida d.pdf
30. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard–Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>
31. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI Supplement M100S. 19087 USA, 2016. [citado: 25 de May de 2017]. Disponible en URL: <http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>
32. Sistema de Gestión de la Calidad del Pronahebas, Ministerio de Salud (MINSA). Manual de Bioseguridad: Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre, 2004. norma técnica N° 015 - MINSA / DGSP - V.01. 2004. Perú. [citado: 2017 Jun 2]. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/manual%20de%20bioseguridad.pdf>
33. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. [citado: 25/07/17]. Disponible en URL: http://cmp.org.pe/wp-content/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

$$n = \frac{(z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

$$\frac{Z_{\alpha}}{2} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

\bar{x}_1 : = 21 mm ²⁹ Diámetro del halo de inhibición del ciprofloxacino

\bar{x}_2 : = 23 mm Diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico de *Moringa oleífera* “*moringa*” según Hitzschky G et al.¹²

$$\sigma: 2.5^{12}$$

$n = 9.8 \approx 10$ (repeticiones por cada dilución)

Teniendo en cuenta 4 diluciones y el antibiótico, se multiplica por 5, por lo que lleva a observar:

$n = 10 \times 5 = 50$ observaciones.

ANEXO 02

Determinación Taxonómica de *Moringa oleífera* por el HERBARIO MOL - Augusto Weberbauer de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina LIMA – PERU



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento Académico de Biología




La Molina, 25 de septiembre de 2018

CONSTANCIA 016-2018-HM-UNALM


Mediante la presente se informa que la muestra de "Moringa" adquirida en el vivero de la Universidad Nacional Agraria La Molina (departamento de Lima, provincia de Lima, distrito de La Molina) y remitida por la Srta. Ruth Cira Cáceres Iquiapaza, correspondiente al proyecto de investigación «Efecto Antimicrobiano del Extracto Etanólico de las Hojas de *Moringa oleífera* "moringa" Comparado con Ciprofloxacino, sobre Cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, In Vitro», ha sido estudiada en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL) para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en tal espécimen permiten concluir que corresponde a la especie *Moringa oleífera* Lam. de la familia Moringaceae. La clasificación taxonómica de la especie según el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) es la siguiente:

Clado	:	angiospermas (Angiospermae)
Clado	:	mesangiospermas (Mesangiospermae)
Clado	:	eudicotiledóneas (Eudicotyledoneae)
Clado	:	gunneríidas (Gunneridae)
Clado	:	pentapétalas (Pentapetalae)
Clado	:	superrósidas
Clado	:	rósidas
Clado	:	eurrósidas
Clado	:	málvidas (Malvidae)
Orden	:	Brassicales
Familia	:	Moringaceae
Género	:	<i>Moringa</i> Adans.
Especie	:	<i>Moringa oleífera</i> Lam.

Atentamente,


Mercedes Flores Pimentel
Jefe
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Agraria La Molina




Arturo Granda Paucar
Investigador Adjunto
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Agraria La Molina

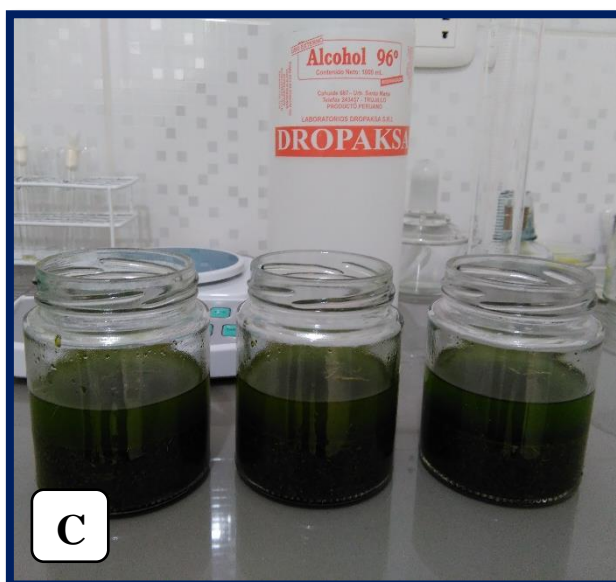
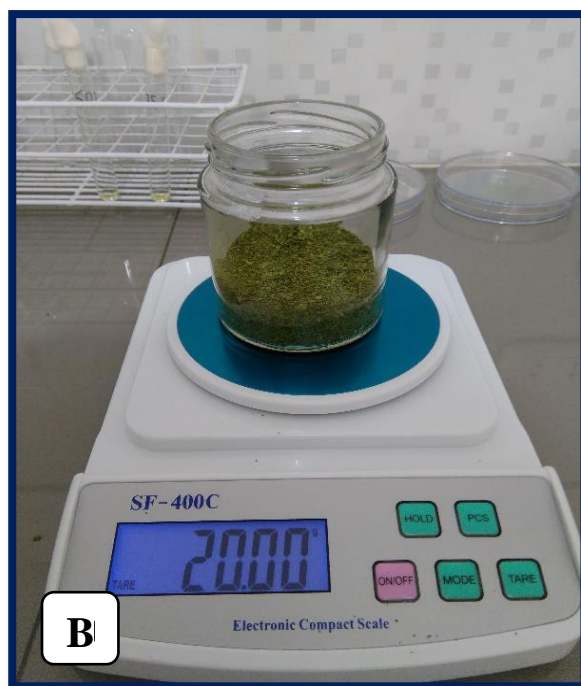
Obtención del extracto etanólico de *Moringa oleífera*, mediante el método de maceración en etanol

1. Tratamiento de la muestra vegetal

Las plantas frescas de *Moringa oleífera* “moringa”, se obtuvieron en el vivero de la Universidad Nacional Agraria La Molina, procedentes de la ciudad de Lima, en una cantidad de 2 Kg aproximadamente, una vez que se hizo la selección y la identificación de la planta luego se transportó hacia el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



Planta – *Moringa oleífera* “moringa”



Proceso de obtención del extracto etanólico de hojas de *Moringa oleífera* “moringa”.

- A.** Lavado y secado de las hojas de la planta y listas para Deshidratarlas en el horno.
- B.** Pesado de las hojas (20g), Deshidratadas y pulverizadas.
- C.** Adición de alcohol 96°
- D.** Macerado por 8 días en papel aluminio.

2. Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico de *Moringa oleífera* se obtuvo por el método de maceración en etanol de 96°; para ello, se colocó en un frasco de vidrio 20 g de MS y 100 ml de etanol, se tapó el frasco herméticamente y se cubrió totalmente con papel aluminio. Luego, se dejó en lugar fresco y seco, a temperatura ambiente, por 8 días con agitación de 3 a 4 veces diarias. Después, se hizo una doble filtración. Primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de un papel filtro Whatman N°41. Este filtrado, se evaporó por ventilación con corrientes de aire frío en circuito cerrado en estufa, por 2 días, hasta que quede a una concentración mayor a 100 mg/mL. De este modo, se obtuvo el extracto etanólico (EE) considerado al 100%; el cual, se reservó en un frasco de vidrio ámbar a 6°C hasta su utilización.



A. Filtrado de la maceración



B. Ventilación en estufa del extracto etanólico de *Moringa oleífera*:

ANEXO 04

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Müller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 13 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.



A. Siembra de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922

B. Preparación de las diferentes diluciones del extracto etanólico de *Moringa oleífera* (100%, 75%, 50%, 25%) y control positivo (ciprofloxacino)

ANEXO 05

4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100-S28.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Escherichia coli*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aprox.)

b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Escherichia coli*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

c) Preparación de las concentraciones del EE

A partir del EE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 µL de EE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de EE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de EE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%.

d) Preparación de los discos de sensibilidad con EE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 µL en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 µL de EE al 25% y se colocó en un disco, 10 µL de EE al 50% en otro disco, 10 µL de EE al 75% en otro disco y 10 µL de EE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 13 veces.

e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Escherichia coli*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con ciprofloxacino 5µg (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

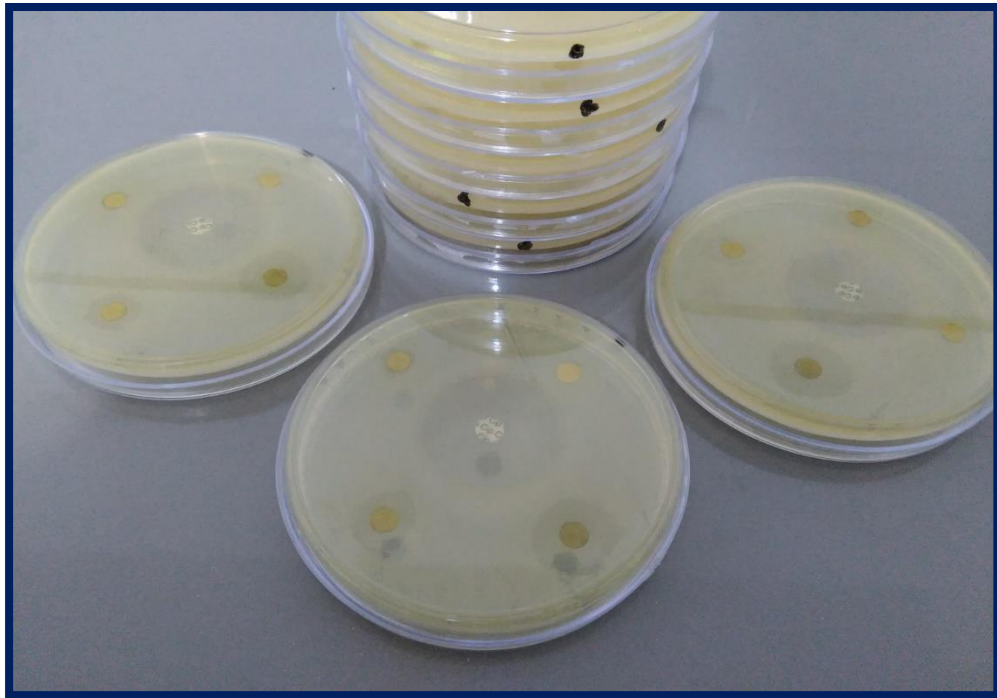
f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de EE de *Moringa oleífera* y para el ciprofloxacino. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100-S28 del CLSI.

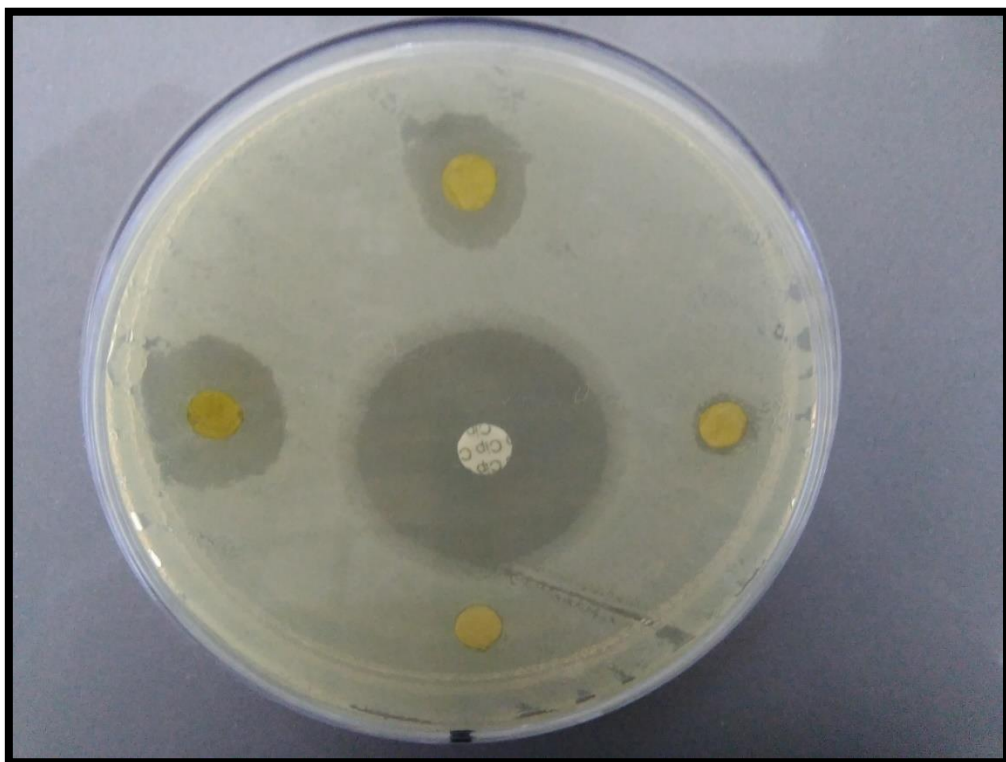


A. Preparación de los discos de sensibilidad

B. Confrontación del extracto etanólico *Moringa oleífera* Contra cepas de *E. coli*



Halos de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Moringa oleífera* “moringa” y control positivo (ciprofloxacino)



Halos de inhibición después de incubación a 37°C por 24 horas



ANEXO 06



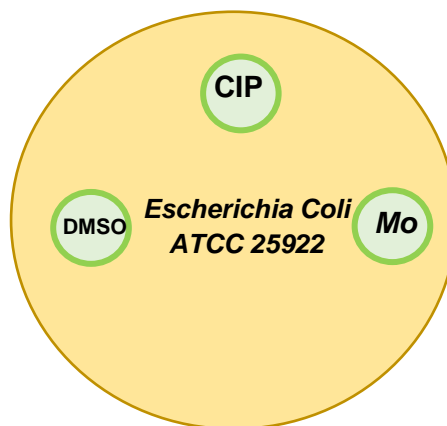
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm) SOBRE CEPAS DE *Escherichia Coli* ATCC 25922

PATOGENO <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Moringa oleífera</i> "Moringa"				CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
	100%	75%	50%	25%	CIPROFLOXACINO 5ug	Dimetil Sulfóxido (DMSO)
	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
PLACA 1	18	15	0	0	31	0
PLACA 2	19	14	0	0	29	0
PLACA 3	18	14	0	0	29	0
PLACA 4	16	14	0	0	29	0
PLACA 5	18	13	0	0	31	0
PLACA 6	18	15	0	0	30	0
PLACA 7	18	13	0	0	29	0
PLACA 8	19	14	0	0	30	0
PLACA 9	17	14	0	0	29	0
PLACA 10	16	13	0	0	30	0
Promedio del diámetro del halo de inhibición	17.70	13.90	0.00	0.00	29.70	0.00

Placas Petri con cultivo de *Escherichia Coli* ATCC 25922

LEYENDA
CIP: Ciprofloxacino
Mo: <i>Moringa oleífera</i>
DMSO: Dimetil Sulfóxido





FICHA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1												
2												
3												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIONES
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos						
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación						
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial						
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir						
VALIDEZ						
APLICABLE			NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN	

Validado por

Fecha:

Firma y sello

Firma y sello

Firma y sello

ANEXO 08

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL ESTUDIO EXPERIMENTAL ³²

AMBIENTE SEGURO:

Limpieza: se lavará con agua y detergente, luego sin éste, realizando una acción mecánica o de arrastre sobre las superficies. La limpieza se realizará antes de todos los procedimientos de desinfección y esterilización todas las áreas.

La limpieza se realizará con paños húmedos y el barrido por medio de escoba húmeda, con la intención de prevenir la resuspensión de los microorganismos que se encuentran en el piso. Se iniciará por las partes más altas, siguiendo la línea horizontal, descendiendo por planos.

Desinfección: Se realizará utilizando principalmente agentes químicos en estado líquido, como el alcohol a 70%, la pasteurización a 75°C y la irradiación ultravioleta.

Descontaminación: Se realizará un tratamiento químico aplicado a objetos que tuvieron contacto con sangre o fluido corporales, con el fin de inactivar microorganismos en piel u otros tejidos corporales.

Esterilización: Esterilización por vapor, esterilización por calor seco, esterilización por inmersión en productos químicos.

PROTECCIÓN CORPORAL

Se hará uso de mandiles o batas, siendo esta una prioridad multifactorial para el ingreso al área de trabajo, y en la realización de todos los procedimientos por parte de los integrantes del equipo.

Recomendaciones:

- Se usará bata, chaqueta o uniforme dentro de las instalaciones de trabajo (laboratorio).
- Esta ropa protectora será retirada inmediatamente antes de abandonar el laboratorio.
- Luego será transportada de manera adecuada a un lugar específico para posterior descontaminación y lavado.

PROTECCIÓN OCULAR Y TAPABOCA

- El uso de lentes y de mascarillas tiene como fin proteger las membranas de las mucosas de boca, nariz y ojos durante los procedimientos y actividades que puedan generar aerosoles, y salpicaduras de fluidos.
- Anteojos o lentes de Seguridad:
- Permiten una correcta visión.
- Tienen protección lateral y frontal, ventilación indirecta, visor de policarbonato, sistema antirrayaduras y antiempañantes.
- Permiten el uso simultáneo de lentes correctores.
- Son de uso personal.
- Serán usados en todo momento durante los procesamiento de las muestras y el fraccionamiento de las unidades de fluidos. Cualquier excepción a esta regla, fue descrita en el programa de bioseguridad del servicio.

TAPABOCA:

- Es de material impermeable frente a aerosoles o salpicaduras.
- Es amplio de tal forma que cubre la nariz y toda la boca.
- Será utilizado por el equipo durante todo el tiempo manteniéndolo limpio y sin deformación.

PROTECCIÓN DE LOS PIES:

La protección se realizará para evitar lesiones producidas por sustancias corrosivas, descargas eléctricas, objetos pesados, así como para prevenir deslizamientos en pisos húmedos. Si cayera al suelo una sustancia corrosiva o un objeto pesado.

No se llevará ninguno de los siguientes tipos de calzados para transitar en el laboratorio:

- Zuecos

- Tacones altos
- Zapatos que dejen el pie al descubierto
- Se elegirá un calzado de cuero resistente que cubrió todo el pie. Este tipo de calzado proporcione una mejor protección.

PROTECCIÓN DE LAS MANOS

Se hará uso de guantes para prevenir o disminuir el riesgo de contaminación con los microorganismos de la piel del operador, como de la transmisión de gérmenes manipulados hacia el operador. Se lavarán las manos según técnica clínica con solución a base de clorhexidina y secadas antes del calzado de los guantes los cuales serán estériles.



ANEXO 09

COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente: ensayos

HSD Tukey

(I) grupos	(J) grupos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
EE Moringa oleífera al 100%	EE Moringa oleífera al 75%	3,800*	,306	,000	2,93	4,67
	EE Moringa oleífera al 50%	17,700*	,306	,000	16,83	18,57
	EE Moringa oleífera al 25%	17,700*	,306	,000	16,83	18,57
	CIPROFLOXACINO	-12,000*	,306	,000	-12,87	-11,13
EE Moringa oleífera al 75%	EE Moringa oleífera al 100%	-3,800*	,306	,000	-4,67	-2,93
	EE Moringa oleífera al 50%	13,900*	,306	,000	13,03	14,77
	EE Moringa oleífera al 25%	13,900*	,306	,000	13,03	14,77
	CIPROFLOXACINO	-15,800*	,306	,000	-16,67	-14,93
EE Moringa oleífera al 50%	EE Moringa oleífera al 100%	-17,700*	,306	,000	-18,57	-16,83
	EE Moringa oleífera al 75%	-13,900*	,306	,000	-14,77	-13,03
	EE Moringa oleífera al 25%	,000	,306	1,000	-,87	,87
	CIPROFLOXACINO	-29,700*	,306	,000	-30,57	-28,83
EE Moringa oleífera al 25%	EE Moringa oleífera al 100%	-17,700*	,306	,000	-18,57	-16,83
	EE Moringa oleífera al 75%	-13,900*	,306	,000	-14,77	-13,03
	EE Moringa oleífera al 50%	,000	,306	1,000	-,87	,87
	CIPROFLOXACINO	-29,700*	,306	,000	-30,57	-28,83
CIPROFLOXACINO	EE Moringa oleífera al 100%	12,000*	,306	,000	11,13	12,87
	EE Moringa oleífera al 75%	15,800*	,306	,000	14,93	16,67
	EE Moringa oleífera al 50%	29,700*	,306	,000	28,83	30,57
	EE Moringa oleífera al 25%	29,700*	,306	,000	28,83	30,57

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 10



CONSTANCIA DE ASESORÍA DE DESARROLLO DE TESIS

El que suscribe **MG. BLGO. POLO GAMBOA, JAIME ABELARDO**, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, de la alumna: **CÁCERES IQUIAPAZA RUTH CIRA**, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulada:

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Moringa oleífera*
“moringa” COMPARADO CON CIPROFLOXACINO SOBRE *Escherichia coli*
ATCC25922**

Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor técnico, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 12 días del mes de agosto del 2018.

ANEXO 11



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO



CONSTANCIA DE ASESORÍA DE DESARROLLO DE TESIS

La que suscribe **DRA. LLAQUE SÁNCHEZ, MARÍA ROCÍO DEL PILAR**, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, de la alumna: **CÁCERES IQUIAPAZA RUTH CIRA**, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulada:

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Moringa oleífera*
"moringa" COMPARADO CON CIPROFLOXACINO SOBRE *Escherichia coli*
ATCC25922**

Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor metodológico, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 31 días del mes de octubre del 2018.

ANEXO 12

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

**San José**
LABORATORIO CLÍNICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde la Srta. CÁCERES IQUIAPAZA RUTH CIRA, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Moringa oleifera* "moringa" comparado con ciprofloxacino, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, in vitro", durante los días 6 al 10 de agosto de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, sólo para fines académicos, a los 12 días del mes de agosto de 2018.


José Luis Calla Quevea
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 9301

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - ☎ 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/